

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-228089

(43) 公開日 平成4年(1992) 8月18日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395

C 1 2 N 5/10

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8214-4B

ADD N 8413-4C

8828-4B

7236-4B

C 1 2 N 15/00

5/00

A

B

審査請求 未請求 請求項の数13(全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平3-110565

(22) 出願日

平成3年(1991) 5月15日

(31) 優先権主張番号

特願平2-124581

(32) 優先日

平2(1990) 5月15日

(33) 優先権主張国

日本 (J P)

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 江口 行生

兵庫県明石市大久保町大程250-1 パ

レ・ロワイヤル番館701号

(72) 発明者 長岡 哲也

兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 光雲寮

(72) 発明者 国広 茂樹

兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 光雲寮

(72) 発明者 旭 孝司

兵庫県神戸市垂水区つつじが丘3丁目10-6

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 高カルシウム血症治療・予防剤

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパク (PTHrP) に対して特異性を有するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマにより生産される。このハイブリドーマは、PTHrPまたはその部分配列を有するペプチドにより免疫された動物由来の抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合により得られる。さらに該モノクローナル抗体の変換領域の遺伝子をクローニングし、これを用いてげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体が作成される。

【効果】 上記モノクローナル抗体は、高カルシウム血症治療・予防剤として有用である。本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、従来の抗血清あるいはポリクローナル抗体を用いた方法よりも高成績でかつ比較的長期間にわたり高血症を治療することが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体およびその関連物質でなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤。

【請求項2】 前記モノクローナル抗体のF(ab')フラグメントおよび/または該フラグメントを含むペプチドを含む請求項1に記載の治療・予防剤。

【請求項3】 ハイブリドーマEV034B1GまたはEV01411Gの産生するモノクローナル抗体の群から選択されるモノクローナル抗体を含有する請求項1に記載の治療・予防剤。

【請求項4】 前記モノクローナル抗体のF(ab')フラグメントおよび/または該フラグメントを含むペプチドを含む請求項3に記載の治療・予防剤。

【請求項5】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のH鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片。

【請求項6】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のL鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片。

【請求項7】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、モノクローナル抗体。

【請求項8】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、モノクローナル抗体。

【請求項9】 げっ歯類由来の可変部領域およびヒト由来の定常部領域を有し、ヒトの副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体、またはその誘導体。

【請求項10】 前記キメラモノクローナル抗体が高カルシウム血症の治療効果を有する、請求項9に記載のモノクローナル抗体またはその誘導体。

【請求項11】 請求項9に記載のキメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子。

【請求項12】 請求項10に記載のキメラモノクローナル抗体およびその誘導体の少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤。

【請求項13】 請求項1、3、7、9または11のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するセルライン。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体（以下、抗PTHrPモノクローナル抗体とする）を有効成分とする抗高カルシウム血症治療・予防剤に関する。さらに詳細には、本発明は医療分野において副甲状腺ホルモン関連タンパク（以下、PTHrPとする）の産生により発症する高カルシウム血症の治療および予防、さらには再発の防止に用いられる抗PTHrPモノクローナル抗体を有効成分とする治療・予防剤に関する。本発明はさらに、上記モノクローナル抗体の可変部領域のH鎖をコードする遺伝子断片およびL鎖をコードする遺伝子断片；げっ歯類由来の上記可変部領域とヒト由来の定常部領域とを有するキメラモノクローナル抗体、該キメラモノクローナル抗体を含有する高カルシウム血症治療・予防剤；および該キメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子に関する。本発明は、さらに上記モノクローナル抗体を産生するセルラインに関する。

【0002】

【従来の技術】 高カルシウム血症は、医療分野においてしばしば見い出される電解質異常症であり、患者に種々の苦痛を与えるのみならず、重篤な場合は生命を脅かすおそれがある。高カルシウム血症を惹起する原因疾患は多様であるが、高頻度でかつ重篤な高カルシウム血症を引き起こす原因疾患としては、悪性腫瘍および副甲状腺ホルモン（以下、PTHとする）の過剰産生による副甲状腺機能亢進症が挙げられる。

【0003】 このうち、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症は、その発生機序から、腫瘍細胞の骨への浸潤により骨溶解が亢進し高カルシウム血症がもたらされる症例（Local Osteolytic Hypercalcaemia）と、腫瘍から産生される体液性因子が全身性に作用し高カルシウム血症が惹起される症例（Humoral Hypercalcaemia of Malignancy, 以下、HHMとする）との2つに大別される。その代表的な前者の例としては、多発性骨髄腫、乳癌などの骨転移などによる高カルシウム血症が挙げられ、後者（HHM）の例としては、扁平上皮癌、腎尿路系の癌などに伴う高カルシウム血症などが挙げられる。

【0004】 このうち、HHMは、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の80%以上を占める最も頻度の高い腫瘍随伴性症候群である。このHHMは、悪性腫瘍患者の末期に急速に発症し進展することが多く、さらに特異的治療法が存在しないことから多くの患者の死亡原因となっている。

【0005】 HHMの発症原因となる体液性因子については、多くの研究者により種々の研究がなされてきた。Stewart, A. F. らは、HHM患者の血漿中にPTHとは異なるがPTH類似の作用を示す物質の存在を証明し、かつ、HHMを惹起する悪性腫瘍細胞がこの物質を産生していることを明らかにした（Stewart, A. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80巻, 1454頁(1983)；およびGoltzman,

D. ら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 53巻, 899頁(1981))。

【0006】Martin, T. J. のグループは、高カルシウム血症を呈した肺癌患者の癌細胞(BEN細胞)の培養上清からPTH様活性を有する物質を単離し、該物質のN末端の一次構造を明らかにした。さらに、該細胞のmRNAを用いてPTH様物質のcDNAを単離し、PTH様物質の前駆体の全一次構造を決定した(Moseley, J. M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻, 5048頁(1987); およびSuvva, L. J. ら, Science, 237巻, 893頁(1987))。そこではPTH様物質はPTHrPと称され、36個のシグナルペプチドに続く141個のアミノ酸残基よりなること、そして、C末端の一次構造はPTHと殆ど類似性がないが、N末端の1-13位のアミノ酸のうち8個は同一のアミノ酸からなると報告されている。PTHがその受容体と結合する機能; PTHが腎原性サイクリックAMPの産生を亢進する機能など、PTHがその生理活性を発現するにはN末端部分が不可欠であるとされている。従って、PTHrPがPTHと類似のN末端アミノ酸構造を有しているためにPTH様活性を有すると考えられる。

【0007】Horiuchi N. らは、PTHrPの1-34位のペプチドを化学合成しラットに投与すると、高カルシウム血症状態を示すことを報告している(Science, 238巻, 566頁(1987))。さらに、Kukreja, S. C. らは、高カルシウム血症を呈した肺癌患者および喉頭癌患者のそれぞれの癌細胞を無胸腺マウスに移植し、高カルシウム血症を示した時点でPTHrP(1-34)およびPTHrP(1-16)ペプチドに対するウサギ抗血清を投与すると、一部のマウスで血中カルシウムが正常レベルに減少したことを報告している(J. Clin. Invest., 82巻, 1798頁(1988))。このように、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質としてPTHrPが重要な役割を果たしていることが知られている。

【0008】ところで、従来、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療には補液、およびフロセミドもしくはエタクリン酸を併用するが、一般にはこれだけでは不十分であり、さらにカルシトニン、ミスラマイシンなどの追加投与を必要とする。しかし、カルシトニンは連続投与により効果が低下すること、そして、ミスラマイシンは重篤な副作用を惹起するなどの欠点があり、十分な効果を発揮するには至っていない。このような悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療には、上記のようにPTHrP活性を特異的に阻害する薬剤が好ましいと考えられる。PTHrP活性だけを特異的に抑制する方法としては、上記のKukreja, S. C. らの研究例があるが、報告されている方法はウサギ抗血清あるいはそれを精製して得られるポリクローナル抗体を用いているため、治療成績が悪く、かつ、有効症例においてもその有効期間は非常に短いという欠点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来の問題点を解決するものであり、その目的とするところは、高カルシウム血症に有効な治療・予防剤を提供することにある。本発明の他の目的は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症に有効な治療・予防剤を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の問題点を克服するため鋭意研究を重ねた結果、ヒトPTHrPに対して特異性を有するモノクローナル抗体を取得することに成功し、該モノクローナル抗体を用いることにより、高カルシウム血症を高成績で、かつ比較的長期間にわたり治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】本発明の高カルシウム血症治療・予防剤は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体およびその関連物質でなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有し、そのことにより上記目的が達成される。

【0012】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のH鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片を包含する。

【0013】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のL鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片を包含する。

【0014】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を包含する。

【0015】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を包含する。

【0016】本発明は、げっ歯類由来の可変部領域およびヒト由来の定常部領域からなり、ヒトの副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体、およびその誘導体を包含する。

【0017】本発明は、前記キメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子を包含する。

【0018】本発明は、上記キメラモノクローナル抗体およびその誘導体の少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤を包含する。

【0019】本発明は、上記モノクローナル抗体を産生するセルラインを包含する。

【0020】本発明のモノクローナル抗体を調製するた

めには、従来からのモノクローナル抗体調製法を用いる

5

ことができる。つまり、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られたハイブリドーマの中からPTHrP活性を特異的に阻害する抗体を産生しているクローンを選択することによって調製される。

【0021】上記免疫に用いられる抗原としては、組換えDNA法または化学合成法により調製したPTHrPのアミノ酸配列の全部または一部のペプチドや、高カルシウム血症を惹起した癌細胞の培養上清液由来のPTHrPなどが利用可能である。PTHrPのアミノ酸配列の一部を含有するペプチドとしては、例えばPTHrPのN末端部分に位置する、次の配列（配列番号7に示す）を有するペプチドが挙げられる：Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-Leu-His-His-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-His-Thr-Ala。抗体産生細胞は、例えばPTHrPまたはその一部に相当するペプチド（同等の作用を有する物質）によってインビボあるいはインビトロで免疫された動物あるいはヒトの脾細胞由来のあるいはリンパ節細胞由来のBリンパ球や、患者末梢血由来のBリンパ球が使用できる。

【0022】細胞融合に用いるミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト、およびその他の動物由来のミエローマ細胞を用いることができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコールを用いる方法（岩崎辰夫ら、「単クローン抗体、ハイブリドーマとELISA」講談社発行（1983）参照）により行うことができる。細胞融合によって得られたハイブリドーマはスクリーニング（例えば、酵素抗体法）に付され、抗体を産生するハイブリドーマが選択される。得られた抗体産生ハイブリドーマはクローニング（例えば、限界希釈法）に付される。得られたクローンは、次いでスクリーニングに付され、目的とするモノクローナル抗体を産生するクローンが選択される。例えば、ラット骨芽腫細胞ROS17/2.8細胞またはUMR106細胞にPTHrPを添加することにより、アデニレートサイクเลส活性が向上する（アデニレートサイクเลส促進活性が得られる）が、これに対して、抗PTHrPモノクローナル抗体が存在すると、その活性が阻害されることによってスクリーニングが行われる。

【0023】得られたハイブリドーマのうちEV034B1GおよびEV01411Gの2種は、微生物工業技術研究所特許微生物寄託センターにそれぞれ微工研菌寄第11429（FERM P-11429）および第11430号（FERM P-11430）として寄託されている。EV034B1Gは、PTHrPの1-34アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製され、目的とする抗体を産生するハイブリドーマクローンである。EV01411Gは、組換えDNA法により得られたPTHrP（以下、rPTHrPとする）を抗原として調製され、目的抗体を産生するハイブリドーマクローンである。

【0024】得られたハイブリドーマによる抗PTHrPモノクローナル抗体の産生量は、該ハイブリドーマを培養

6

し、その培養上清中の抗体価を、例えば酵素抗体法で測定することによって検定することができる。得られたハイブリドーマから抗PTHrPモノクローナル抗体を得るには、例えば、該ハイブリドーマを培養し、その培養上清から適切な方法により抗体を分取するか、または、ハイブリドーマをあらかじめプリスタン処理したマウスの腹腔内に移植し、増殖させた後、そのマウスの腹水から抗体を分取する。抗PTHrPモノクローナル抗体の調製には、組換えDNA法を用いた動物細胞または微生物を用いることも可能である。上記抗体の精製は、通常の生化学的手法を組み合わせることによって行われ得る。例えば、硫酸沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、PEG分画法、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動などを適宜組み合わせることによって行われ得る。精製されたモノクローナル抗体は、生物学的製剤の製剤化に通常用いられる方法によって製剤化される。例えば、メンブランフィルターなどによる濾過除菌操作を行った後に、安定化剤と共に滅菌バイアルに凍結乾燥される。

【0025】このようにして得られた抗PTHrP抗体の、高カルシウム血症の治療・予防効果は、高カルシウム血症モデル動物に、抗PTHrPモノクローナル抗体を投与し、血中カルシウムレベルの低下の有無によって調べる実験系を用いることにより確認される。上記高カルシウム血症モデル動物としては、例えば、発病の原因等であるPTHrPあるいはPTHrP（1-34）ペプチドを1日当たり約6ナノモル連続投与することによって作製した高カルシウム血症モデル動物、あるいはPTHrPを産生するヒト癌細胞（例えばPC-3細胞）をヌードマウスに移植することによって得られる拒癌高カルシウム血症モデル動物がある。本発明の抗PTHrPモノクローナル抗体は、このいずれの方法においても血中カルシウムレベルを正常レベルまで下げることが確認された。従って、本発明の抗PTHrPモノクローナル抗体は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療・予防剤として非常に好適であり、産業上の利用価値がきわめて高い。

【0026】さらに、モノクローナル抗体そのものに限定されず、その関連物質、つまり該モノクローナル抗体の免疫学的特性を有するフラグメント、例えば、F(ab')フラグメント、さらに、該フラグメントを含むペプチドを含有する製剤も高カルシウム血症治療・予防剤として使用され得る。

【0027】発明者らは、さらに、上記抗PTHrPモノクローナル抗体の抗原認識部位に関する検討を行った。発明者らは、上記モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖の変異領域の遺伝子配列を明かにすることを試みた。上記H鎖の変異領域をコードする遺伝子（VDJ<sub>H</sub>）およびL鎖の変異領域をコードする遺伝子（VDJ<sub>L</sub>）は、該モノクローナル抗体を産生するハイブリ

一マから、下記のようにmRNAを単離し、cDNAを合成して、これを用いたPCR法を行うことにより決定され得る。

【0028】まず、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、例えば、前記のEVO34BIGまたはEVO34BIGから、一般的手法により全RNAを抽出する。さらに抽出された全RNAから、常法により、例えば、市販のキットであるオリゴテックス-dt30(宝酒造社製)を用いて、mRNAの単離を行う。次いで、得られたmRNAからcDNAを合成し、これをPCRの鋳型とする。

【0029】次に、IgGの変数領域中に存在する保存的な配列をKabatらのデータファイル(Sequences of Proteins Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)から採用し、この配列からプライマーを設計する。上記配列は成熟タンパク質のアミノ末端付近に対応するDNA配列であり、シグナル配列が含まれていない。この配列の一部をPCRに用いるプライマーとして選択する(プライマーの配列を配列番号8~11に示す)。PCRにより得られる変数領域遺伝子の塩基配列を、例えば、Sanger, F.ら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74巻, 5463頁(1977))のジデオキシ法あるいはそれを改良した方法により決定する。

【0030】このようにして得られたDNA配列を配列番号5(H鎖)および配列番号6(L鎖)に示す。プライマー部分の配列を考慮すると、H鎖の変数領域をコードする遺伝子は、配列番号5の34番目のCから354番目のTまでのDNA配列を有することがわかる。プライマー部分を除いた目的のDNA配列に対応するアミノ酸配列を配列番号1に示す。L鎖の変数領域をコードする遺伝子は、配列番号6の32番目のCから340番目のAまでのDNA配列を有する。このDNA配列に対応するプライマー部分を除いた目的のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0031】ところで、上記ハイブリドーマEVO34BIG, EVO1411Gなどにより産生される抗PTHrPモノクローナル抗体は、高カルシウム血症の治療・予防剤として有用であるが、これらのハイブリドーマはげっ歯類であるマウス由来であるため、これをヒトに長期間投与するとアレルギー反応が起こる場合がある。上記のように、このモノクローナル抗体の変数領域の配列が明らかになったため、次に発明者らは、これをヒト抗体の定数領域に結合させたげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体の調製を試みた。

【0032】本発明のげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体を作製するために必要なヒト免疫グロブリン定数領域遺伝子(H鎖の定数領域に対応する遺伝子: C $\gamma$ 1、およびL鎖の定数領域に対応する遺伝子: C $\kappa$ )は、例えば、ヒト免疫グロブリン産生ガン細胞AR

H-77[ATCC(アメリカン タイプカルチャーコレクション)より入手可能である]から得られうる。

まず、ARH-77(ATCC CRL-1621)を培養し、得られた細胞からゲノムDNAを得る。このゲノムDNAから目的とするDNA断片を得るために必要とされる制限酵素を用いて完全に分解した後、アガロースゲル電気泳動で分子量分離し、該目的のDNA断片(C $\gamma$ 1を含むDNA断片およびC $\kappa$ を含むDNA断片)を得る。

【0033】このようにして得られるDNA断片は、適当なクローニングベクターに組み込まれて、DNAライブラリーが構築される。例えば、ヒトIgGのC $\gamma$ 1を含むDNA断片は、EcoRIで切断したラムダクローニングベクターEMBL4(ストラタジーン社製)にクローニングし、H鎖ファージライブラリーが構築される。一方、ヒトIgGのC $\kappa$ を含むDNA断片は、EcoRIで切断したラムダクローニングベクター $\lambda$ gt10(ストラタジーン社製)にクローニングし、同様にし、L鎖ファージライブラリーが構築される。

【0034】このようにして増幅されたDNA断片から、目的とするC $\gamma$ 1およびC $\kappa$ 断片を、プローブを用いたハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする。上記プローブは、Billison J. W.ら(Nucleic Acids Research, 10巻, 4071頁(1982)が明かにしたC $\gamma$ 1およびC $\kappa$ の配列に基づいて作製される。例えばC $\gamma$ 1の遺伝子から2個のプローブ(プローブH1およびH2;それぞれ配列番号12および13に示される)が設計される。プローブH1およびH2は、ARH-77のJ $\mu$ 領域(Kudou A. J. Imm. 135巻, 642頁(1985))およびフレームワーク領域に対応する遺伝子配列である。他方、C $\kappa$ 遺伝子からプローブL1(配列番号14に示す)が設計される。

【0035】上記ヒトIgG定数領域遺伝子のスクリーニングは、常法に従って、ブラークハイブリダイゼーション法により行われる。まず上記各々のファージライブラリーを適切な株に感染させ、上記プローブとハイブリダイズするブラークをスクリーニングする。次にジデオキシ法で塩基配列の決定を行い、タンパク質をコードする部分の遺伝子が、すでに明らかになっているC $\gamma$ 1またはC $\kappa$ の配列と一致することを確認する。それぞれの挿入断片を適当な制限酵素を用いて切り出し、サブクローニングする。例えば、C $\gamma$ 1断片をHindIIIとXbaIとで切り出し、pUC19にサブクローニングし、C $\gamma$ 1断片を有するベクターであるpUC-C $\gamma$ 1を得る。同様にC $\kappa$ 断片をEcoRIで切り出し、pUC19にサブクローニングし、C $\kappa$ を有するベクターであるpL14-2を得る。

【0036】上記抗PTHrP抗体のH鎖の変数領域をコードするマウス由来のDNA配列、抗PTHrP抗体のL鎖の変数領域をコードするマウス由来のDNA

配列、ヒトIgGのH鎖の定常部領域をコードするDNA発現ベクターを構築し、これを適当な宿主に導入して得られる形質転換体により、上記マウス由来の抗PTHrP抗体の変常部領域とヒトIgGの定常部領域とを有するキメラモノクローナル抗体が生産され得る。

【0037】上記発現ベクターの構築を行うために、まず、上記マウスVDJ<sub>H</sub>遺伝子の修飾を行い、タンパク質の分泌に不可欠なシグナル配列を付加する。例えば、Cabilly, Sらの報告(Proc. Natl. Sci. USA., 81巻, 3272頁(1984))にある抗PTHrP抗体(Anti-CEA MoAb)のH鎖のシグナル配列の一部に対応する部分を含む遺伝子を合成する。これをプライマー(配列番号15に示す)とし、上記VDJ<sub>H</sub>遺伝子を鋳型としたPCRを行い、シグナル配列が付加されたLVDJ<sub>H</sub>遺伝子が得られる。同様に、マウスVJ<sub>L</sub>遺伝子についても上記Anti-CEA MoAbのL鎖のシグナル配列の一部に対応する部分を含む遺伝子を合成し、これをプライマー(配列番号16に示す)としてPCRを行い、シグナル配列が付加されたLVJ<sub>L</sub>遺伝子が得られる。

【0038】本発明のキメラ抗体発現ベクターを調製方法の一例を次に説明する。

【0039】まず、pSveSalI-HindIII(ヨーロッパ特許出願公開No. 0420502をHindIIIで切断して、平滑末端化し、pXbaIリンカーを付加し、T4DNAリガーゼで環状化するとpSveXbaIが得られる(図2)。このベクターにはXbaI認識部位の上流にSV40の複製起点を含む初期プロモーター領域が存在している。次に、上記ヒトH鎖C $\gamma$ 1遺伝子を含むプラスミドpUC-C $\gamma$ 1から切り出した、C $\gamma$ 1遺伝子を含むDNA断片と；上記マウスH鎖のLVDJ<sub>H</sub>遺伝子断片を含む断片と；pSveXbaIをXbaIで切断したベクターとを連結することによりpSveH26が構築される(図2参照)。

【0040】これとは別に、C $\kappa$ 遺伝子をpUC19にサブクローニングして得られるベクターpL14-2(前出)由来のC $\kappa$ 遺伝子を含む断片；およびpSveXbaIの切断断片をT4DNAリガーゼで連結することにより、pSveL26が得られる(図3)。

【0041】上記pSveL26由来のmLVJ<sub>L</sub>遺伝子およびC $\kappa$ 遺伝子を有するDNA断片；およびpSveH26由来のmLVDJ<sub>H</sub>遺伝子およびC $\gamma$ 1遺伝子とを有するDNA断片とを連結することにより、これら4種の遺伝子を有する発現ベクターであるpSveHL26が構築される(図4)。さらに、この発現ベクターを動物細胞に導入することを考慮し、該ベクターに適当な薬剤耐性遺伝子、例えば、DHFRおよびEcoR<sup>r</sup>ptが導入され、pSveHL26-DMが構築される(図5)。

【0042】このようにして得られた発現ベクターは、

適当な宿主、例えば、マウス骨髓腫細胞あるいは、ハムスター細胞株に導入される。例えば、マウス骨髓腫細胞であるF0細胞にDEAE-デキストラン法で発現ベクターが導入され得る(高井俊行、細胞工学、9巻、652頁(1990))。あるいは、ハムスター細胞であるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(ATCC CCL-61)にリン酸カルシウム法で、Chenら、(Mol. Cell Biol., 7巻、2745頁(1987))の方法により、発現ベクターが導入され得る。

【0043】宿主に発現ベクターが導入されたか否かは、該ベクターが有する薬剤耐性マーカーを利用して調べることが可能である、このようにして得られた形質転換体が産生する抗体は、PTHrPに対する結合能を調べることにより抗PTHrPモノクローナル抗体であることが確認される。産生された抗体量は、例えば、ELISA法により測定され得る。本法により得られた代表的な形質転換体の名称を後述の実施例10の表2に示す。

【0044】このような形質転換体を適当な培地で培養することにより抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体が生産される。このモノクローナル抗体は、上記マウス由来のモノクローナル抗体と同等の性能を有し、高カルシウム血症の治療・予防剤として好適に利用され得る。さらに、このモノクローナル抗体をヒトに長期間にわたり投与した場合もマウス由来のモノクローナル抗体の場合とは異なり、アレルギー反応を引き起こすことがない。

【0045】上記組み換えによるキメラ抗体発現ベクターの構築において、例えばマウスモノクローナル抗体遺伝子の可変部領域遺伝子の特定部位を変異することにより、生成する抗体の1個または数個のアミノ酸の置換、欠失、付加あるいは転位を起こさせることが可能であり、よりPTHrPに対して特異性や親和性の高い抗体に改良することができる。

【0046】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0047】【実施例1】(rPTHrPの調製) Martin, T. J. ら(J. Biol. Chem., 264巻, 14806頁(1989))の方法に準じ、次のようにPTHrP遺伝子を合成し、大腸菌に組み込んで発現させてrPTHrPを得、これを後述の実施例4で得られた抗PTHrPモノクローナル抗体で精製した。

【0048】まず、DNA合成機(アプライドバイオシステム社製)を用いて、約110merの大きさのDNA(いずれもPTHrPの1~141位のDNAのうちの一部)を8本合成し、各DNAをODSカラム(山村化学研究所製)を用いた高速液体クロマトグラフィー(島津製作所社製)で精製し、次いでアニールを行った。その後、各DNAフラグメントをT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)により連結させ、

目的とするPTHrP(1-141)遺伝子を得た。このPTHrP遺伝子をベクターpKK233-2(ファルマシア社製)に組み込んで発現ベクターを得た。これを大腸菌JM105に導入して形質転換体を得た。このrPTHrP発現大腸菌を大量調製した後、超音波処理により大腸菌を溶菌させた後、rPTHrPを抽出した。rPTHrP抽出物をセファクリルS-200HR(ファルマシア社製)を用いてゲル濾過し、分子量1万5千〜3万付近を分画した。この画分を、CNBr活性化セファロース4B(ファルマシア社製)と、後述の実施例4で精製して得た抗PTHrP(1-34)モノクローナル抗体とをカップリングさせた(5ng/担体)抗体カラムにチャージして精製した。一回の精製で取得されたrPTHrPは約10mgであった。

【0049】【実施例2】(抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製) PTHrPのN末端部分のペプチドであるPTHrP(1-34)(ペプチド研究所製)、または実施例1で得られたrPTHrPペプチド50μgをフロイント完全アジュバントと混合した後、8〜12週令のBalb/cマウスの皮下へ免疫した。初回免疫後、3週間隔で計3回の追加免疫を行った。細胞融合に供する7日、5日、3日、2日、および1日前に、マウス尾静脈より一匹当たり5μgの上記ペプチドを投与した。その後、マウス脾を摘出し、免疫脾細胞を得た。

【0050】次に、免疫脾細胞とマウスミエローマ細胞(P0)とを2:1の割合で混合し、ポリエチレングリコール1500の存在下で融合させ、10%FBSを含むイスコフ改変ダルベッコ培地に、脾細胞が $2 \times 10^6$ 個/mlになるように調整し、96穴マイクロプレートに0.1ml/ウェルの割合で分注した。翌日、HAT培地を0.1ml/ウェルの割合で加え、以後1日おきに培地の半量を新しいHAT培地と交換した。約2週間後、ハイブリドーマのコロニーの形成が見られた。このコロニーをさらに24穴プレートで培養し、PTHrP(1-34)由来のハイブリドーマコロニー420株およびrPTHrP由来のハイブリドーマコロニー617株を得た。

【0051】これらのハイブリドーマコロニーの培養上清中に抗PTHrPモノクローナル抗体が産生されているかを、次のように酵素抗体法により検討した。まず、rPTHrPを用い、100ng/ウェルの割合でコーティングした96穴プレートにハイブリドーマの培養上清を加え、37℃で1時間反応させた。洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG+IgMを加えた。さらに洗浄した後、o-フェニレンジアミン液を加え、室温にて20分間発色させた。4N硫酸を加えて反応を停止させた後、492nmで吸光度を測定した。

【0052】以上の操作により、抗原としてPTHrP(1-3

4)を用いた場合には191株の、またrPTHrPを用いた場合には358株の抗PTHrPモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマコロニーが得られたことがわかった。

【0053】次に、これらのハイブリドーマコロニーの培養上清を用いて、rPTHrPに対する抗PTHrPモノクローナル抗体の中和活性について検討した。Gutierrez, G. E. ら(J. Biol. Chem., 262巻, 15845頁(1987))の方法に準じて、次の方法により、 $[^3H]$  アデニンを取り込ませた、ROS17/2.8細胞またはUMR106細胞における $[^3H]$  ATPから $[^3H]$  cAMPへの変換を指標として測定した。まず、48穴マルチウェルプレートに $2.5 \times 10^4$ 個/ウェルのROS17/2.8細胞またはUMR106細胞を接種し、FBSを10%の割合で添加したDME培地中で3日間培養した。培養液を除去した後、Hanksの平衡塩類液で2回洗浄し、新しい培地および $1 \mu Ci/ml$ の $[^3H]$  アデニンを加え、37℃で2時間インキュベートした。細胞をさらに2回洗浄した後、1mM3-イソブチル-1-メチルキサンテン(IBMx; シグマ社製)を含み、FBSを2%の割合で添加したDMEM培地50μlを加え37℃で5分間インキュベートした。次いでハイブリドーマ培養上清25μlおよびrPTHrP溶液(最終濃度 $10^{-7} \sim 10^{-11} M$ ) 25μlを加え、さらに10分間インキュベートした。次いで、トリクロロ酢酸(最終濃度0.12M) 1mlを加えて反応を終了させ、4N NaOH 20μlで中和した。合成されたcAMPは、Salomon, Y. ら(Anal. Biochem., 58巻, 541頁(1974))の方法にしたがって分離した後、その放射活性を測定し、rPTHrPに対する抗PTHrPモノクローナル抗体の中和活性を評価した。

【0054】以上の操作により、抗原としてPTHrP(1-34)を用いた場合には108株が、そしてrPTHrPを用いた場合には35株が、rPTHrPを中和する活性を有する抗PTHrPモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマコロニーであることがわかった。

【0055】【実施例3】(ハイブリドーマにより産生された抗PTHrPモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスおよびサブクラス) 実施例2で得られた中和活性のある抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株が産生する抗PTHrPモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスおよびサブクラスについて検討した。イムノグロブリンクラスおよびサブクラスの検討は、免疫グロブリンサブクラスポリクローナル抗体を用い、実施例2で用いた酵素抗体法に従って行った。代表例としてPTHrP(1-34)由来およびrPTHrP由来の各々5株、計10株の結果を表1に示す。

【0056】

【表1】



ハイブリドーマ (株名)	サブクラスポリクローナル抗体との反応性				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
EVO34B1G	+				
EVO34B2AG		+			
EVO34B4M					+
EVO34B2BG			+		
EVO34B3G				+	
EVO1411G	+				
EVO1413G				+	
EVO1412AG		+			
EVO1411M					+
EVO1412BG			+		

【0057】【実施例4】(抗PTHrPモノクローナル抗体の調製) 実施例3のハイブリドーマクローン10株の細胞を各々、2週間前にプリスタン0.5mlを腹腔内投与した10~12週令Balb/cマウスの腹腔内に、 $5 \times 10^6$ 個/匹の割合で接種した。腹水が十分に生産された後、この腹水を回収した。腹水中のモノクローナル抗体は、硫酸塩析し、さらに10mMリン酸二水素カリウム(pH6.0)で透析した後、ベーカーボンドABXカラム(J. T. ベーカー社製)を用いて250mMリン酸二水素カリウム(pH6.8)のグラジエントにより精製した。得られた抗PTHrPモノクローナル抗体は20.5~58.7mgであった。

【0058】【実施例5】(抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症動物モデルでの特性) 実施例4で得られた抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症動物モデルでの治療・予防効果を、浸透圧ポンプ(アルザ社製; モデル2002)を用いた系で検討した。まず、浸透圧ポンプに1%牛血清アルブミンを含む生理食塩水に溶解させたrPTHrP (1.75mg/ml) 200 $\mu$ lを充填し、その浸透圧ポンプを10週令のBalb/cマウスの腹腔内に埋め込み、2日毎に尾静脈より血液を50 $\mu$ lずつ採取し、血清中のCaレベルを原子吸光度計(日立製作所; モデル26100)を用いて測定した。

【0059】予備実験で浸透圧ポンプをマウス生体内に埋め込んだ後、約5~6日目まで血清中のCaレベルが19~20mg/dlになることが判明したので、浸透圧ポンプを埋め込んでから6日目に、実施例4で精製した抗PTHrPモノクローナル抗体300 $\mu$ gをマウス尾静脈内へ投与してその効果を検討した。その結果を図1に示す。図1に示すように、実施例4で得られた精製抗PTHrPモノクローナル抗体は高カルシウム血症治療・予防剤として有効であることが判明した。

【0060】【実施例6】(抗PTHrPモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片の調製) 0.05Mクエン酸ナトリウム/0.15M NaCl (pH4.0) の緩衝液に実施例4で得られた精製抗PTHrPモノクローナル抗体を溶解させ、これをペプシン(シグマ社製)を用いて37℃で5分間消化した。上記ペプシンは該抗PTHrPモノクローナル抗体の35分の1重量の量を使用した。次いで、3M トリス (pH8.6) を1/3容量添加して反応を停止させた。

【0061】消化物を10mM リン酸二水素カリウム (pH6.0) で透析した後、ベーカーボンドABXカラム (J. T. ベーカー社製) を用いて、250mMリン酸二水素カリウム (pH6.8) のグラジエントによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、精製F(ab')<sub>2</sub>断片を回収した。非還元条件下でのSDS-PAGEゲル電気泳動により検討したところ、分子量122,000ダルトンの単一バンドが得られた。

【0062】このF(ab')<sub>2</sub>断片精製物は、酵素抗体法、アデニレートサイクレス促進活性の阻害活性および高カルシウム血症動物モデルにおいて、消化前のIgGと同一の特異性および反応性を有していることが確認された。

【0063】【実施例7】(抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからの該モノクローナル抗体可変部領域遺伝子 [VDJ<sub>H</sub> (H鎖) およびVJ<sub>L</sub> (L鎖)] の単離) 以下のように、抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからmRNAを単離しcDNAを合成後、PCR (ポリメラーゼチェーンリアクション) 法を用いて、VDJ<sub>H</sub>遺伝子およびVJ<sub>L</sub>遺伝子のクローニングを行った。

#### 【0064】7-1. 全RNAの抽出

ハイブリドーマ細胞EVO34B1Gの培養液を遠心分離 (1200rpm) にかけて、該ハイブリドーマ細胞を約 $3 \times 10^6$ 個得た。これを、リン酸緩衝化生理食塩水 (以下PBSと略す) で洗浄し、この細胞からトータルRNAセパレーター (クローンテック社製) を用いて全RNAを抽出した。その方法は添付されたプロトコルに従った。得られたRNAをトリス-EDTA緩衝液 (以下TEと略す) (pH7.5) に溶解させて全RNAサンプルとした。

#### 【0065】7-2. mRNAの精製

上記7-1項で抽出した全RNAからのmRNAの精製は、オリゴデックス-dt30 (宝酒造社製) を用いて行った。方法は添付されたプロトコルに従い、フェノールで抽出して、エタノール沈殿後、TEに溶解させて、mRNAサンプルを得た。

#### 【0066】7-3. cDNAの合成

可変部領域の遺伝子 (VDJ<sub>H</sub>およびVJ<sub>L</sub>) をPCR法によってクローニングするため、7-2項で得られたm



RNAからcDNAを合成した。合成はcDNA合成試薬(ファルマシア社製)を使用し、付属のプロトコールに従った。このプロトコールはGubler, U. ら (Gene, 25巻, 263頁(1983)), Hanahan, D. (DNACloning(Glover, D. M., 編), IRL Press, Oxford, 1巻, 109頁(1985)), Scalenghe, F. ら (Chromosoma 82巻, 205頁(1985)), Okayama, H. ら (Methods in Enzymology 154巻, 3頁(1987))などの文献を参考にしている。得られたcDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、スパンカラムで精製することによりcDNAサンプルを得た。

#### 【0067】7-4. 可変部領域遺伝子(VDJ<sub>H</sub>およびVJ<sub>L</sub>)のクローニング

IgGの可変部領域中の保存的なDNA配列を、Kabatらのデータファイル(Sequences of Proteins Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, (1987))から採用した。このヌクレオチド配列は、成熟タンパク質のアミノ末端から始まるアミノ酸配列をコードしており、このタンパクのシグナル配列は含まない。このDNA配列をもとに、PCRに用いる次の4種のプライマー(配列番号8~11に塩基配列を示す)を作成した。これらのプライマーは、DNA合成機(アプライドバイオシステムズ社製 Model 381A)にて合成した: VDJ<sub>H</sub> 5' 5'-TCTAGAAATGC AGGT(CT)CAGCT G(AC)AGCAGTC(AT) GG 3' VDJ<sub>H</sub> 3' 5'-GGTGTTCCTC GAGGTCTAGT GACCGTGTC CCT(GT)(CG)(GA)CCCC AG 3' VJ<sub>L</sub> 5' 5'-CGTGGCTCTA GAAGAAAT TG TG(AC)TGACCCA GTCTCCA 3' VJ<sub>L</sub> 3' 5'-AACTCGAGCC A GCTTGGTCC C(CA)(CG)C(AT)CCGAA CGTG 3'.

【0068】上記VDJ<sub>H</sub> 5' およびVDJ<sub>H</sub> 3' またはVJ<sub>L</sub> 5' およびVJ<sub>L</sub> 3' をプライマーとし、上記cDNAを鋳型として、PCRを行うことにより抗体可変部領域の特異的な配列(H鎖またはL鎖の)が増幅される。PCR法によるDNA増幅についてはEhrlich, H.A. 編 (PCR Technology, Stockton Press(1989))に記載されている。本実施例においては遺伝子増幅試薬(宝酒造社製)を用いて上記PCRを行った。cDNAクローニングに用いた上記プライマーは制限酵素切断部位を有しているため、cDNAクローニングおよび増幅の結果、VDJ<sub>H</sub>およびVJ<sub>L</sub>のそれぞれ5' 側にXbaI 或いは3' 側にXhoI が導入される。

#### 【0069】7-5. 可変部領域遺伝子の塩基配列

7-4でクローニングした可変部領域遺伝子の塩基配列をSanger, F. ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74巻, 5463頁(1977))のジデオキシ法を改良した試薬(東洋紡績社製)を用いて塩基配列を決定した。その結果を配列番号5および配列番号6に示す。さらに、それらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号3および配列番号4に示す。

【0070】[実施例8] (ヒト免疫グロブリン定常部領域遺伝子(C<sub>H</sub>1(H鎖)および、C<sub>K</sub>(L鎖))の

クローニング) マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体を作成するために必要なヒトのC<sub>H</sub>1およびC<sub>K</sub>をヒト免疫グロブリン産生細胞ARH-77からクローニングした。

#### 【0071】8-1. 染色体DNAの分離

ヒト免疫グロブリン産生細胞ARH-77(ATCC CRL-1621)を、10%牛胎児血清(以下FCSと略する、大日本製薬社製)を含むRPMI 1640培地(大日本製薬社製)で培養した。得られた細胞をPBSで洗浄し、TNE溶液[10mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1M NaCl, 1mM EDTA]に均一に懸濁した。そこに、プロテイナーゼK(ペーリンガー社製)を、最終濃度が0.1mg/mlになるように、そしてSDSを、その最終濃度が0.3%になるようにそれぞれを加えて攪拌後、60℃に4時間保った。等量のフェノールを加えて2時間攪拌した後、3000rpmで、10分間遠心分離して水層を回収し、もう1度フェノール抽出を繰り返した。水層に等量のクロロホルムを加えて緩やかに浸漬後、3000rpmで、5分間遠心分離した。これに0.1容量の3M酢酸ナトリウムおよび等容量のイソプロパノールを加えて、繊維状になった染色体DNAをガラス棒に巻き取り、エタノールで洗浄した後、風乾し、適量のTEに溶解した。10分間煮沸した1mg/mlのRNaseを1/50量加えて1時間37℃でインキュベートした後、再びフェノール抽出、エタノール沈澱を行って精製した。最終的にTEに溶解することにより染色体DNAを約3mg得た。

#### 【0072】8-2. C<sub>H</sub>1を含むDNA断片およびC<sub>K</sub>を含むDNA断片の調製

8-1項で得られた染色体DNAを、次のように制限酵素で完全分解した後、アガロースゲル電気泳動で分子量分画した。まず、染色体DNA300μgを10mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム中で300unitのEcoRIとともに1晩37℃に保持し、完全切断した。これをフェノール抽出し、エタノール沈澱後、TEに溶解させた。このサンプルを0.75%アガロース電気泳動で、100Vで、3時間泳動後、同時に泳動した分子量マーカーをもとに約2kbおよび約15kbと思われる位置のゲルに切れ込みを入れた。そこにDEAEペーパー(東洋濾紙社製DEAEイオン交換フィルター)を差し込み泳動を続けることで2-4kbおよび15-30kbのDNAをペーパーに吸着させた。目的のDNAを吸着させた後、ゲルからペーパーを取り出し1.5M塩化ナトリウム溶液中でペーパーからDNAを溶出し、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行い、TEに溶解させた。このようにしてC<sub>H</sub>1を含むDNA断片またはC<sub>K</sub>を含むDNA断片が溶解したTE溶液が得られた。

#### 【0073】8-3. 染色体DNAファージライブラリ

## 一の調製

8-2項で得られたC $\gamma$ 1を含むDNA断片(15-30 kbのDNA) 1  $\mu$ gと、EcoRIで切断したラムダクロニングベクターEMBL4 (ストラタジーン社製) 2.5  $\mu$ gとをライゲーション試薬(宝酒造社製)を用い、26℃で10分間反応させて連結した。このようにして、C $\gamma$ 1を含むDNA断片のクローニングを行った。その後、in vitro パッケージング試薬(ストラタジーン社製)のプロトコールに従ってパッケージングしてH鎖ファージライブラリーとした。

【0074】これとは別に、8-2項で得られたC $\kappa$ を含むDNA断片(2-4 kbのDNA) 1  $\mu$ gとを、E\*

プローブH1 (配列番号12に示す)

5' AGGTGACGCTACAGCAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGA 3'

プローブH2 (配列番号13に示す)

5' ACTACTACTATGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGACACGGTCACCGTCTCTCA 3'

これらのプローブは、DNA合成機で合成された。これらのプローブはそれぞれARH-77のJ $\mu$ 領域およびフレームワーク領域の遺伝子配列である。

※20

プローブL1 (配列番号14に示す)

5' ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT 3'

このプローブもDNA合成機で合成された。この配列はC $\kappa$ 遺伝子の5'末端側50 bpの配列である。プローブの標識は、DNA 5'末端標識用試薬(宝酒造社製)を用いて行った。65℃で10分加熱して酵素を失活させた後、セファデックスG-50を詰めたカラム(ファルマシア社製)で精製して使用した。

【0077】8-5、ヒトIgG定常部領域遺伝子のスクリーニング

C $\gamma$ 1およびC $\kappa$ 遺伝子のスクリーニングは常法に従ってブラークハイブリダイゼーション法で行った。8-2項で作製したファージライブラリーのうちC $\gamma$ 1を含むDNAを有する $\lambda$ EMBL4は大腸菌P2-392株に、C $\kappa$ を含むDNAを有する $\lambda$ gt10はNM514株に感染させ、8-4項で作製したプローブとハイブリダイズするブラークをスクリーニングした。その結果、プローブH1およびH2とハイブリダイズする株H1-8、そして、プローブL1とハイブリダイズする株L14-2を得た。それらから得られた挿入断片の塩基配列をジデオキシ法で決定した。タンパク質をコードする部★

プライマーL $\mu$  5' CCTCTAGATGAACCTCGGGCTCAGCTTGATTACCTTGCTCGGTTTAA  
AAGTTGTCAGTGTCTCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAC 3'

そして得られたDNA断片をpUC19のXbaI-SaI1部位にサブクローニングした。

【0080】同様にマウスVJ $\mu$ 遺伝子にも次のようにしてシグナル配列を付加した。まず、Anti-CEA MoAbのL鎖シグナル配列に対応する部分を含む遺伝子を合成

プライマーL $\mu$  5' CCTCTAGATGGGCATCAAGATGGAGACACATTCAGGCTCTTTGATACA  
TGTTGCTGTGGTGTCTGGTGTGAAGGAGAAATGTGATGACCCAGTCT

18

\*c o R Iで切断したラムダクロニングベクター $\lambda$ gt10 (ストラタジーン社製) 2.5  $\mu$ gとをライゲーション試薬(宝酒造社製)を用いて、26℃で10分間反応して連結した。このようにC $\kappa$ を含むDNA断片のクローニングを行った。

【0075】8-4、ヒトIgG定常部遺伝子のプローブの作製

Ellison, J.W.ら (Nucleic Acids Research, 10巻, 4071頁 (1982)) が明らかにしたARH-77由来のC $\gamma$ 1の配列から次に示すプローブH1およびプローブH2を設計した。

10

※【0076】これとは別に、Ellison, J.W. (前出) のC $\kappa$ 遺伝子から次に示すプローブL1を設計した。

★分の遺伝子は、どちらにおいても既知の配列と一致することを確認した。それぞれの挿入断片を制限酵素HindIIIおよびXbaI、あるいはEcoRIを用いて切り出し、pUC19にサブクローニングし、pUC-C $\gamma$ 1あるいはpL14-2を得た。

【0078】【実施例9】(キメラ抗体発現ベクターの作製) キメラ抗体発現ベクターは以下のようにして作製した。

【0079】9-1 マウス遺伝子の修飾

7-4項でクローニングしたマウスVDJ $\mu$ 遺伝子にはタンパク質の分泌に不可欠なシグナル配列が含まれていない。従って、Cabilly, S.らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81巻, 3272頁(1984))にある抗体 (Anti-CEA MoAb) のシグナル配列に対応する部分を含む遺伝子を合成し、これをプライマー (プライマーL $\mu$ ) としてPCRを行った。その結果、該抗体のシグナル配列がVDJ $\mu$ 遺伝子に付加されたLVDJ $\mu$ 遺伝子を得た。そのプライマーL $\mu$ の配列を以下に示す。さらに、配列番号15に示す。

し、これをプライマーとしてPCRを行い、シグナル配列がVJ $\mu$ 遺伝子に付加されたLVJ $\mu$ 遺伝子を得た。これをpUC19のXbaI-SaI1部位にサブクローニングした。プライマーL $\mu$ の配列を以下に示す。さらに配列番号16に示す：

【0081】9-2. キメラ抗体発現ベクターの調製  
 まず、pSveSalI (特開昭62-14783) を制限酵素NcoIで切断し、大腸菌内での複製起点 (ori) 及びアンピシリン耐性を付与する約4.7kbの断片を単離した。T4DNAリガーゼを用いてこれを環状化し、pSveSalI-HindIII (ヨーロッパ特許出願公開No. 0420502) を作成した。これを大腸菌 (E.coli) DH5αに導入して増幅させた。このベクターを図2に示すように、HindIIIで切断、平滑末端化し、pXbaIリンカーを付加し、T4DNAリガーゼで環状化しpSveXbaIを得た。これを大腸菌DH5αに導入して増幅させた。図2に示すように、このベクターpSveXbaIにはXbaI認識部位の上流にSV40の複製起点を含む初期プロモーター領域が存在している。次に、実施例8で得られたプラスミドpUC-Cγ1 (ヒトH鎖Cγ1遺伝子を含む制限酵素HindIII+XbaI断片約6kbがサブクローニングされている) からHindIIIとXbaIとでCγ1遺伝子を切り出した。このCγ1遺伝子と、上記9-1項で得られたマウスH鎖のLVJ<sub>H</sub>遺伝子断片と、pSveXbaIをXbaIで切断したベクターとをT4DNAリガーゼで連結してpSveH26を構築した。その工程を図2に示す。

【0082】次に、実施例8で得られたpL14-2 (ヒトCκ遺伝子をpUC19にサブクローニングして得られる) の5'末端に近いEcoRI部位のみを部分分解し、さらにpHindIIIリンカーを用いてHindIII部位に変換した (図3参照)。これをEcoRIおよびHindIIIで切断してCκ遺伝子を含む領域を切り出した。次に、pUC19にサブクローニングしたマウスLVJ<sub>L</sub>遺伝子を、XbaI並びにHindIIIで切り出した。上記EcoRI-HindIII断片と、XbaI-HindIII断片と、pSveXbaIをEcoRIおよびXbaIで切断して得られる断片とを、T4DNAリガーゼで連結して、pSveL26を作製した (第3図)。pSveL26は、図3に示すようにmLVJ<sub>L</sub>遺伝子とヒトCκ遺伝子とを有する。

【0083】次に、このpSveL26のTth1111部位を平滑末端にし、pBamHIリンカーを利用してBamHI認識部位を導入した (図4)。そしてEcoRIおよびBamHIで切断することによってmLVJ<sub>L</sub>遺伝子およびヒトCκ遺伝子を含む断片を切り出した。得られた断片とpSveH26をBamHIおよびEcoRIで切断して得られる断片とをT4DNAリガーゼを用いて連結することにより、キメラ抗体発現ベクターであるpSveHL26を得た。上記工程を図4に示す。

【0084】このキメラ抗体発現ベクターを動物細胞へ導入することも考慮し、次のようにして、このベクターに

薬剤耐性遺伝子を導入した。まず、Yamashita, X. らのpSveLTdh (Agric. Biol. Chem., 54巻, 2801頁(1990)) のTth1111部位をBamHI認識部位に変換し、BamHIで切断することによって大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Eco-rgpt) およびジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の、それぞれ発現ユニットを含む遺伝子をBamHI断片として単離した (図5)。この遺伝子断片をpSveHL26のBamHI部位へ挿入、連結してpSveH26-DMを得た。この工程を図5に示す。

【0085】[実施例10] (キメラ抗体発現ベクターの動物細胞への導入および選択) 実施例9-2で作製したpSveHL26-DMをマウス骨髓腫細胞株、あるいはハムスター細胞株に導入した。

【0086】10-1. マウス骨髓腫細胞への遺伝子導入

マウス骨髓腫細胞である、FO細胞に、DEAE-デキストラン法で発現ベクターを導入した。上記方法は、高井ら (高井俊行、細胞工学、9巻, 652頁(1990)) に従った。形質転換株の選択は、10%FCSを含むダルベッコ改良イーグルMEM培地 (DMEM) にセレクション試薬 (最終濃度: 200μg/ml キサンチン、5μg/ml アデニン、5μg/ml チミジン、2.5μg/ml ミコフェノール酸、0.1μg/ml アミノプテリン) を加えた培地で行った。

【0087】得られた形質転換株の抗体産生量を、次のようにELISA法で測定した。まず、96穴プレートに抗ヒトIgGを入れて4℃で1晩コートした後、0.05%Tween 20を含むPBSで洗浄した。次に1%ゼラチンを含むPBSで非特異的反応をブロックした。上記形質転換株の培養上清を各ウエルに入れて37℃に1時間保ち、0.05%Tween 20を含むPBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体 (抗ヒトIgG Fc断片、あるいは抗ヒトIgGκ鎖) を加えて37℃で1時間インキュベートした。その後、発色液 (0.04%オ-フェニレンジアミン、0.033%過酸化水素、25mMクエン酸、50mMリン酸水素2ナトリウム(pH5.0)) を加えた。20分後に、4N硫酸を添加することで反応を停止し、492nmの吸光度を測定して、精製ヒト抗体を標準として生産量を決定した。その結果、表2にその代表例を示すように、抗体を発現している細胞が得られた。これらの株の産生するキメラ抗体を用い、実施例2に従ってPTHrPに対する結合能および中和能を調べたところ、マウスモノクローナル抗体の場合といずれも同等の結果が得られた。

【0088】10-2. ハムスター細胞への遺伝子導入  
 ハムスター細胞であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (ATCC CCL-61) (市販されている) にChen, C. ら (Mol. Cell. Biol., 7巻, 2745頁(1987))

に従って、リン酸カルシウム法で発現ベクターを導入した。形質転換株の選択は、10%FCSを含むDMEMにセレクション試薬（最終濃度：200 $\mu$ g/mlキサンチン、5 $\mu$ g/mlアデニン、5 $\mu$ g/mlチミジン、25 $\mu$ g/mlミコフェノール酸、0.1 $\mu$ g/mlアミノプテリン）を加えた培地で培養して行った。得られた形質転換株の抗体産生量を、10-1項と同様にELISA法で測定した。抗体を産生する株の代表例を表2に示す。これらの株の産生するキメラ抗体を用い、実施例2に従ってPTHrPに対する結合能および中和能を調べたところ、マウスモノクローナル抗体の場合と\*

宿主細胞	形質転換株株名	MTX濃度 [nM]	抗体生産量 [ $\mu$ g/ml]
FO	F26-01	0	1.11
	F26-02	0	0.75
	F26-03	0	0.89
	F26-04	0	1.50
	F26-05	0	1.02
	F26-50	500	0.32
	F26-51	500	1.67
	F26-101	100	1.73
	F26-102	100	3.88
	F26-103	100	5.21
CHO	C26-01	0	0.03
	C26-02	0	0.08
	C26-03	0	0.02
	C26-50	50	0.29
	C26-51	50	0.52
	C26-101	100	0.10
	C26-102	100	1.32
	C26-201	200	1.44
	C26-202	200	1.51
	C26-203	200	0.78
	C26-204	200	1.20

#### 【0091】10-4 形質転換細胞の培養および抗体の精製

実施例10-3で得られた細胞のうち抗体生産量の高いF26-102株およびF26-103株について、それぞれ培養を行った。培養は、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）に5 $\mu$ g/mlトランスフェリンと1mg/mlBSAを添加した無血清培地で行った。5%CO<sub>2</sub>下で37℃にて5日間培養して、約4リットルの培養上清を得た。この培養上清からの抗体の精製は実施例4と同様に行い、キメラ抗体をそれぞれ約12mg得た。

【0092】[実施例11]（キメラ抗体の高カルシウム血症動物モデルでの特性）実施例10-4で精製したキメラ抗体を用いて実施例5と同様に高カルシウム血症動物モデルでの治療および予防効果を測定した。その結果、キメラ抗体はマウスモノクローナル抗体と同程度の効果があり、高カルシウム血症の治療・予防剤として非常に有効であることが明らかになった。

【0093】さらに、PTHrPを産生する前立腺癌細胞PC-3（大日本製薬より購入）をヌードマウスに移植し、血中カルシウムレベルが18~20mg/dlになった時点で、実施例4または10-4で調製した抗体をそれぞれ300 $\mu$ g尾静脈より投与（各n=5）し、高カルシウム血症治療・予防効果を検討した。その結

\*いずれも同等の結果が得られた。

#### 【0089】10-3. キメラ抗体産生細胞の育種

上記10-1項および10-2項で得られたキメラ抗体発現ベクターを含む形質転換株を、50nMから200nMのメソトレキセート（MTX 武田薬品工業社製）を含む培地で約1週間培養を続け、MTX耐性を示す株（DHFR遺伝子を有する株）を分離した。その結果得られた株の代表例を表2に示す。

【0090】

【表2】

果、各抗体投与区のマウスはすべて生存しており、1週間以上にわたり正常カルシウムレベルが維持された。これに対して、対照区のマウスのカルシウムレベルは18~20mg/dlと不変であり、平均3~4日後にはほとんどのマウスが死亡した。

【0094】

【発明の効果】本発明によれば、このように抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体またはそれらのフラグメントを含む高カルシウム血症治療・予防剤が得られる。これを用いると、従来の抗血清あるいはポリクローナル抗体を用いた方法に比べ、高成績でかつ比較的長期間にわたり高カルシウム血症を治療することが可能となる。

【0095】さらに、本発明においては、上記抗体の可変部領域の配列を解明させた。これを利用して、遺伝子操作の技術により、ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体が調製される。これを主成分とする高カルシウム血症予防・治療剤を投与するとアレルギー反応がより低くおさえられるため、十分な治療効果が得られる。

【0096】

【配列表】

【0097】

【配列番号：1】配列の長さ：98

(13)

特開平4-228089

23

24

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

\*フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴

\* 特徴を決定した方法：E

配列

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser  
 20 25 30  
 His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly  
 35 40 45  
 Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val  
 50 55 60  
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu  
 85 90 95  
 Phe Gly  
 98

【0098】

【配列番号：2】配列の長さ：92

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20※配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴

※ 特徴を決定した方法：E

配列

Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp  
 20 25 30  
 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val  
 35 40 45  
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro  
 85 90 92

【0099】

【配列番号：3】配列の長さ：116

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

40 配列の特徴

特徴を決定した方法：E

配列

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly  
 20 25 30  
 Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

(14)

特開平4-228089

25 26  
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala  
 65 70 75 80  
 His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu Phe Gly Tyr Trp Gly Pro Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Val Thr  
 115

【0100】

【配列番号：4】配列の長さ：113

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

10\*配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴

\* 特徴を決定した方法：E

配列

Leu Glu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val  
 20 25 30  
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45  
 Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe  
 85 90 95  
 Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ala  
 100 105 110  
 Arg  
 113

【0101】

【配列番号：5】配列の長さ：356

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

フラグメント型：中間部フラグメント

※

配列

TCTAGA ATG CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT 51  
 GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTT ACT 99  
 GGC TAC TTT ATG AAC TGG GTG ATG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAG 147  
 TGG ATT GGA CGT ATT AAT CCT TAC AAT GGT GAT ACT TTC TAC AAC CAG 195  
 AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCT AGC ACA 243  
 GCC CAC ATG GAG CTC CGG AGC CTG GCA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT 291  
 TAT TGT GCA AGA GGG GGT GTT ACG ACG GAG TTT GGT TAC TGG GGT CCA 339  
 GGG ACC ACG GTC ACT AG 356

【0102】

【配列番号：6】配列の長さ：341

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

(15)

特開平4-228089

27 28

T CTA GAA GAA ATT GTG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT	49
CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT GTA	97
CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC CTG CAG AAA CCA GGC	145
CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG	199
GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC	241
AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG CGA GTT TAT TAC TGC TTT	289
CAA GGT TCA CAT GTT CCG TAC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GCT	337
CGA G	341

【0103】

10 \* 配列の種類：ペプチド

【配列番号：7】配列の長さ：34

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の型：アミノ酸

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

\* 特徴を決定した方法：S

配列

Ala	Val	Ser	Glu	His	Gln	Leu	Leu	His
Asp	Lys	Gly	Lys	Ser	Ile	Gln		
1				5				
10					15			
Asp	Leu	Arg	Arg	Arg	Phe	Phe	Leu	His
His	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	His		
			20				25	
				30				
Thr	Ala							
	34							

【0104】

※鎖の数：一本鎖

【配列番号：8】配列の長さ：32

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTAGAATGC AGGTYCAGCT GMAGCAGTCW GG 32

【0105】

★鎖の数：一本鎖

【配列番号：9】配列の長さ：42

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGTCTCTC GAGGTCTAGT GACCGTGGTC CCTKSRCCTC AG 42

【0106】

☆鎖の数：一本鎖

【配列番号：10】配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGGCTCTA GAAGAAATTG TGMTGACCCA GTC 37

【0107】

◆鎖の数：一本鎖

【配列番号：11】配列の長さ：34

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

AACTCGAGCC AGCTTGGTCC CMSCWCCGAA CGT 34

【0108】

配列の型：核酸

【配列番号：12】配列の長さ：48

50 鎖の数：一本鎖



トポロジー：直鎖状

29

30

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGTGCAGCT ACAGCAGTGG GGCAGCAGGAC TGGTGAAGCC TTCGGAGA

48

【0109】

【配列番号：13】配列の長さ：66

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTACTACTA TGGTATGGAC GTCTGGGGGCC AAG  
GGACCAC GGTCACCGTC TCCTCA

66

【0110】

【配列番号：14】配列の長さ：50

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTTCATCTTC CCG  
CCATCTG ATGAGCAGTT

50

【0111】

【配列番号：15】配列の長さ：89

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGATG AACCTCGGGC TCAGCTTGAT TTACCTTGTC CTGGTTTAA AAGTTGTCCA  
GTGTCAGGTT CAGCTGCAGC AGTCTGGAC

60

89

【0112】

【配列番号：16】配列の長さ：109

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGATG GGCATCAAGA TGGAGACACA TTCTCAGGTC TTTGTATACA TGTGCTGTG  
GTTGCTGGT GTTGAAGGAG AAATTGTGAT GACCCAGTCT CCACTCTCC

60

109

## 【図面の簡単な説明】

【図1】高カルシウム血症動物モデルを用いた、抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症に対する治療・予防効果を示すグラフである。

【図2】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターを調製するために用いられるpSveH26の構築を示す説明図である。

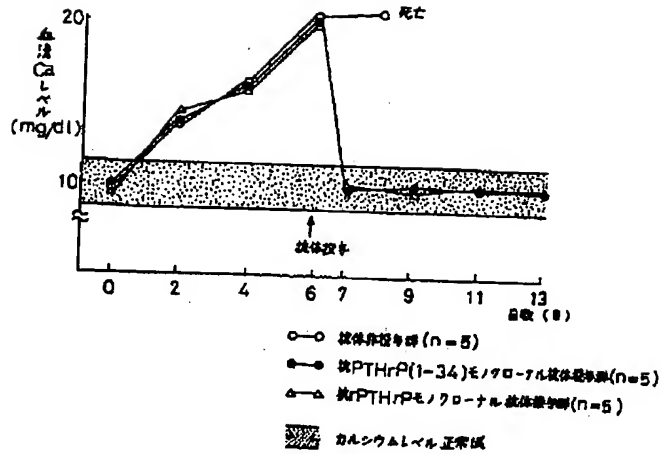
【図3】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードす

る遺伝子を有する発現ベクターを調製するために用いられるpSveL26の構築を示す説明図である。

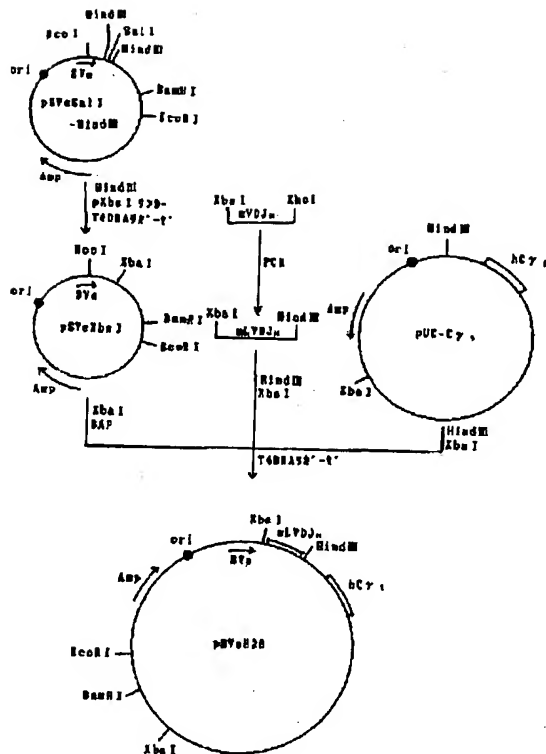
【図4】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターであるpSveHL26の構築を示す説明図である。

【図5】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターであるpSveHL26-DMの構築を示す説明図である。

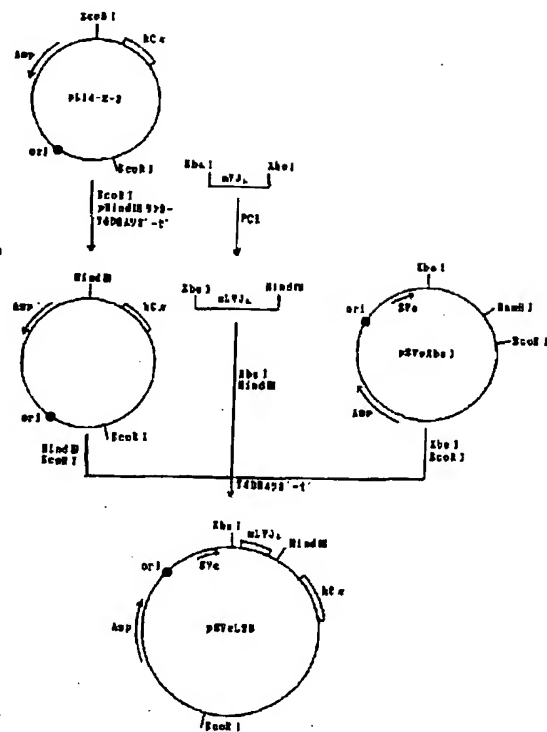
【図1】



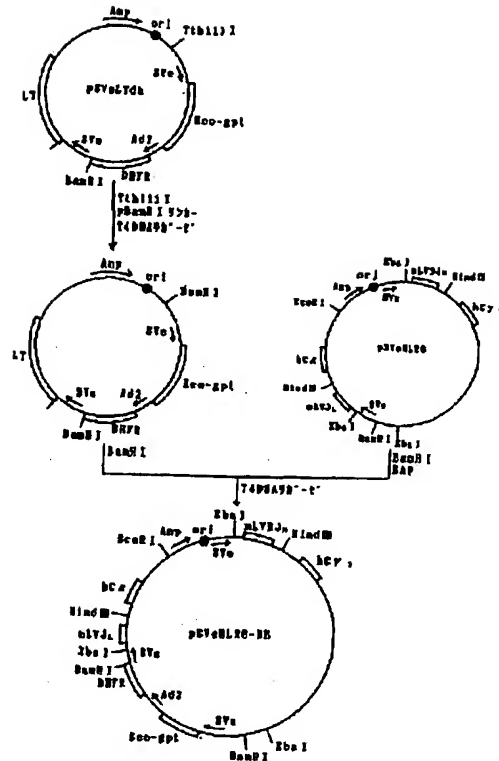
【図2】



【図3】



【图5】



-842-

**(54) GENE OF YEAST BELONGING TO GENUS CANDIDA**

(11) 4-228080 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-116596 (22) 22.4.1991 (33) JP (31) 90p.196226 (32) 26.7.1990  
 (71) TAKARA SHUZO CO LTD (72) OSAMU TAKEDA(4)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12N15/57, C12Q1/04, C12Q1/68//C12Q1/37(C12Q1/04, C12R1/72)

**PURPOSE:** To determine the secretory acidic protease gene sequence characteristic to a pathogenic yeast of genus Candida in a specimen and provide a detection method for the gene sequence and a kit therefor.

**CONSTITUTION:** The objective secretory acidic protease gene of a yeast belonging to the genus Candida has a length of 1023 and is expressed by the sequence number 1 of the sequence table. Also provided are a method for detecting the yeast of the genus candida by detecting said gene and by using a detection kit containing a primer for amplifying said gene and a probe for detecting the amplified DNA. Yeast of the genus Candida in a specimen can be detected in high sensitivity.

**(54) PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN**

(11) 4-228085 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-115224 (22) 20.4.1991 (33) JP (31) 90p.236535 (32) 6.9.1990  
 (71) MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD (72) MASATO TERASAWA(5)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12P13/22//C12P13/22, C12R1/13

**PURPOSE:** To provide a process for producing L-tryptophan in high efficiency by using a microorganism.

**CONSTITUTION:** Enzymatic reaction is carried out in a synthetic medium containing at least glucose and indole and free from biotin by using Brevibacterium flavum MJ-233 strain and the produced L-tryptophan is separated from the reaction liquid.

**(54) AGENT FOR TREATMENT AND PREVENTION OF HYPERCALCEMIA**

(11) 4-228089 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-110565 (22) 15.5.1991 (33) JP (31) 90p.124581 (32) 15.5.1990  
 (71) KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD (72) YUKIO EGUCHI(3)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12P21/08, A61K39/395, C12N5/10, C12N5/20, C12N15/13, C12N15/62//C12N15/06(C12P21/08, C12R1/91)

**PURPOSE:** To obtain the subject new treating and preventing agent capable of curing hypercalcemia in highly desirable result over a relatively long period by using an anti-human parathyroid hormone-relating protein monoclonal antibody or/its relating substance as active component.

**CONSTITUTION:** A hybridoma is prepared by mixing a human parathyroid hormone-relating protein (PTHrP) with Freund's complete adjuvant, immunizing a BALB mouse with the mixture by subcutaneous injection, collecting immunized splenocytes after booster immunization, fusing the cell with a mouse myeloma cell in the presence of polyethylene glycol and culturing the fused cell on HAT medium. The hybridoma is screened to select a clone capable of producing anti-PTHrP antibody, which is cloned by limiting dilution analysis, etc., to obtain a monoclonized hybridoma. The hybridoma is cultured to obtain an anti-PTHrP monoclonal antibody. The objective agent for the treatment or prevention of hypercalcemia can be prepared by using the antibody or its relating substance such as F(ab') fragment as active component.